

[Home](#) | [Products & Service](#) | [Information Desk](#) | [Site Map](#) | [Related Links](#) | [Contact Us](#)

Title: Pit viper venom batroxobin gene cDNA sequence of Dalian Snake Island in Liaoning Prov. of China and its cloning

Application Number: 01106262

Application Date: 2001.02.27

Publication Number: 1370833

Publication Date: 2002.09.25

Approval Pub. Date:

Granted Pub. Date:

International Classification: C12N15/10,C12N15/11,C12N15/52,C12P19/34

Applicant(s) Name: Dalian Science & Engineering Univ.

Address: 116024

Inventor(s) Name: An Lijia, Yang Qing

Attorney & Agent: hou mengyuan

Abstract

The present invention relates to the field of bioengineering, and provides venom batroxibin gene cDNA sequence and corresponding amino acid sequence of Gloydius Shedacensis is Dalian Liaoning provinces; Pichia pastoris secretion type expression vector pPIC9K containing the gene and strain containing the vector; and colibacillus JM109/pPIC9K and Pichia pastoris cell strain GS115/pPIC9K. The present invention may be used in gene method to recombine batroxobin and to diagnose and treat thrombus diseases.

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 01106262.2

[43] 公开日 2002 年 9 月 25 日

[11] 公开号 CN 1370833A

[22] 申请日 2001.2.27 [21] 申请号 01106262.2

[71] 申请人 大连理工大学

地址 116024 辽宁省大连市凌工路 2 号

[72] 发明人 安利佳 杨青 胡学军

[74] 专利代理机构 大连理工大学专利中心

代理人 侯明远

权利要求书 2 页 说明书 16 页 附图页数 0 页

[54] 发明名称 中国辽宁省大连蛇岛蝮蛇毒液中类凝血酶基因 cDNA 序列及其克隆

[57] 摘要

本发明是辽宁省大连蛇岛蝮蛇毒液中类凝血酶基因 cDNA 序列及其克隆, 属于生物工程领域。本发明提供了来自于辽宁省大连蛇岛蝮蛇 (*Gloydius Shedaoensis*) 毒液中编码类凝血酶的基因 cDNA 全序列及其相应的氨基酸序列; 提供了含有该基因的毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) 分泌型表达载体 pPIC9K 以及分别含有该载体的菌株: 大肠杆菌 JM109/pPIC9K 和毕赤酵母细胞株 GS115/pPIC9K。本发明可用于基因工程方法生产重组类凝血酶, 达到诊治和预防血栓类疾病的目的。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

权 利 要 求 书

1. 中国辽宁省大连蛇岛蝮蛇毒液中类凝血酶基因 cDNA 序列及其克隆, 其特征在于它是: 通过对已知核苷酸序列的其他毒蛇毒液的类凝血酶基因进行同源性分析研究, 根据同源性极高的区域设计合成四条寡聚核苷酸引物, 以提取的大连蛇岛蝮蛇毒腺总 RNA 为模板, RT-PCR 方法合成扩增其中的类凝血酶基因序列, 以设计的内侧引物为引物, 进行二次 PCR, 并对此 PCR 产物测序, 由此获得了大连蛇岛蝮蛇 (*Gloydius Shedaoensis*) 毒液中类凝血酶基因 cDNA 的全序列; 同时, 根据类凝血酶的 cDNA 全序列, 设计引物, 将类凝血酶基因编码的成熟类凝血酶基因克隆到表达载体 pPIC9K 中, 并通过热击法将此载体转化至大肠杆菌 JM109 感受态细胞中, 通过电击法将此表达载体整合到毕赤酵母细胞株 GS115 的基因组中。

2. 根据权利要求 1 所述的中国辽宁省大连蛇岛蝮蛇毒液中类凝血酶基因 cDNA 序列及其克隆, 其核苷酸全序列如下:

```
ATGGTGCTGATCAGAGTGCTAGCAACCTTCTGATACTACAGCTGTCTTACGCACAAAAGTCTTCT
GAACTGATCATTTGGAGGTGATGAATGTAACATAAATGAACATCGGTTCTTGTAGCCTTATACACC
TCTAGATCTAGGAGGTTTTATTGCGGTGGGACTTTGATCAACCAGGAATGGGTGCTCACCCTGCA
CACTGCGACAGGAAAAATATCCGGATAAAGCTTGGTATGCATAGCGAAAAGGTACCAAAATGAGGAT
GCAGAGACAAGAGTCCCAAAGGAGAAGTTCTTTTGTCTCAGTAGCAAAACCTACACCAAAATGGGAC
AAGGACATCATGTTGATGAGCTGAAAAGACCTGTTAACAACAGTACACATCGCGCCTGTCAAGT
TGCCTTCCAACCCCTCCAGTGTGGACTCAGTTTGCCGTGTTATGGGATGGGGTACAATCACATCTC
CTCAAGAGACTTATCCCGATGTCCCCATTGTGCTAACATTAACATACTTGATTATGAGGTGTGCA
AGCAGCTCACGGAGGGTTGCCAGCAACAAGCAGAACATTGTGTGCAAGGTATCCTGGGAGGCAAGA
TTCATGTAAGGGTGACTCTGGGGGACCCCTCATCTGTAAGTCTTAAGCCTGGTGTCTACACCAAGG
```

TCTTCGATTATACTGAGTGGATCCAGAGCAATTGCAGGAAATACAGATGCAACCTGCCCCCATGA
 aaacttttgaaggtaagaggagaaaaatgtaacatatctacatctcttccatccctaaccat
 atccaactacattggaatctattcccaggcagtaagctttttaagactcaaataggactgccttt
 gaagtaagaaatgctcaaaaatagtgctgcagggatcatgtccatttaatttcagtataaaacaat
 ctcaagttaaatggaggcctgttttagggtaggtgcaatattttctgactctaaaaatgcaccattc
 caaataattttaacctctgaatatctttccatttctgtccacttctgggacagcggggtccttgatg
 ctctttgagcttgtcttcttgacagcgtttcattaccagctaggtaacatcatcagtgtctagaat
 attctcttctatttggtacttctgtggcatttacaatacgctcatatggagtcagtcagtcacccta
 caaacatatccatataacctgggtccactgggtgcctaaaaaggaccccagattaacccgcactttcc
 aatcctaataatagaatcttttgagaatcgtgttttcatgtaaatctcaggatccacagcaataaa
 attgcataaatcggcataaaaaaaaaaaaaaaaaa

3. 根据权利要求1所述的中国辽宁省大连蛇岛蝮蛇毒液中类凝血酶基因
 cDNA 序列及其克隆，其特征在于：含此类凝血酶基因的表达载体是 pPIC9K/
 类凝血酶基因。

4. 根据权利要求1所述的中国辽宁省大连蛇岛蝮蛇毒液中类凝血酶基因
 cDNA 序列及其克隆，其特征在于：含此类凝血酶基因的表达载体 pPIC9K/类
 凝血酶基因的大肠杆菌 (*E. coli*) 受体细胞是 JM109/类凝血酶基因。

5. 根据权利要求1所述的中国辽宁省大连蛇岛蝮蛇毒液中类凝血酶基因
 cDNA 序列及其克隆，其特征在于：含此类凝血酶基因的表达载体 pPIC9K/类
 凝血酶基因的毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) 受体细胞是 GS115/ pPIC9K/类凝
 血酶基因。

中国辽宁省大连蛇岛蝮蛇毒液中类凝血酶基因 cDNA 序列及其克隆

本发明属于生物工程领域。特别涉及到大连蛇岛蝮蛇毒液中编码类凝血酶的基因全序列的获得及其克隆方法。

在我们地球上,大约生活着 200 多种毒蛇。它们通常被划分成 4 大类: 1) Hydrophidae, 2) Elapidae, 3) Viperidae 和 4) Crotalidae. 蛇毒中富含微量但种类多达 50 多种的蛋白水解酶类。到目前为止,大约有 150 多种不同的蛋白水解酶被分离出来,其中有三分之一的蛋白水解酶的结构已确定。这些蛋白水解酶类通常被依据其水解机制划分成两种类型:丝蛋白酶和金属蛋白酶。类凝血酶作为丝蛋白酶的一种,主要分布在 Viperidae 和 Crotalidae 的毒液中。与凝血酶的作用机理不同的是,类凝血酶仅仅释放纤维蛋白原中的 A 链,而凝血酶是通过将 A 链和 B 链都释放出来从而使纤维蛋白原转化为纤维蛋白的。由于类凝血酶并不激活 factor XIII, 因此所形成的纤维蛋白血块是非交联的,并且易于为血浆降解,从而迅速消除微循环体系中的血栓。由此可见,类凝血酶可以作为一种合适的也许更好的替代药物,如肝素等治疗血栓性疾病。类凝血酶之所以被广泛地研究,其原因就在于它可用于治疗心血管疾病和血栓类疾病的医学前景。

然而,从天然蛇毒中分离提取类凝血酶用于临床虽然已有数十年的历史,但是它的使用仍然受到一些限制。这些限制主要是来自于以下三个方面: 1) 病人出现免疫反应,究其原因主要是由于商品类凝血酶制剂中含有痕量的杂质,即分离纯化所得到的产品不纯; 2) 资源有限并且存在于天然毒蛇毒液中的类凝血酶含量极少因而限制了产量; 3) 分离纯化困难使得生产成本过高,

由于蛇毒中存在 50 种以上的生物活性酶类，每一种酶的含量都很少且性质相似，由此分离纯化非常困难。

众所周知，用基因工程的方法生产蛋白质具有许多明显的优势，如：微生物发酵成本低；表达量往往要高出天然表达量的 10-100 倍，分离纯化变得容易；除目的蛋白质之外的其他活性蛋白质表达量低。由此可见，通过基因工程的方法将类凝血酶基因克隆到微生物体内，特别是在真核细胞中表达生产类凝血酶将克服上述限制，使类凝血酶作为抗血栓药物更大量地用于临床成为可能。

本发明的目的是通过生物工程的方法首次获得辽宁省大连蛇岛蝮蛇毒液中类凝血酶基因 cDNA 序列并克隆到表达载体中，使得用基因工程方法生产重组类凝血酶成为可能，最终达到诊治和预防血栓类疾病的目的。

本发明通过对已知核苷酸序列的其他毒蛇毒腺的类凝血酶基因进行同源性分析研究，根据同源性极高的区域设计合成四条寡聚核苷酸引物，以提取的大连蛇岛蝮蛇毒腺总 RNA 为模板，RT-PCR 方法合成扩增其中的类凝血酶基因序列，以设计的内侧引物为引物，进行二次 PCR，并对此 PCR 产物测序。这些参考的基因是：acutin 来自 *Agkistrodon acutus*, flavoxobin 来自 *Trimeresurus flavoviridis* (habu snake, crotalinae) crotalinae, ancrod 来自 *calloselasma rhodostoma*, batroxobin 来自 *Bothriopsis atrox* and Calobin 来自 *agkistrodon caliginosus*。由此获得了大连蛇岛蝮蛇 (*Gloydius Shedaoensis*) 毒液中类凝血酶基因 cDNA 的全序列。根据类凝血酶的 cDNA 全序列，设计引物，将类凝血酶基因编码的成熟类凝血酶基因克隆到表达载体 pPIC9K 中，并通过热击法将此载体转化至大肠杆菌 JM109 感受态细胞中，通过电击法将此表达载体整合到毕赤酵母细胞株 GS115 的基因组中。

辽宁省大连蛇岛蝮蛇 (*Gloydius Shedaoensis*) 毒液中类凝血酶基因 cDNA

序列如下:

ATGGTGTGATCAGAGTGCTAGCAAACCTTCTGATACTACAGCTGTCTTACGCACAAAAAGTCTTCT
GAACTGATCATTGGAGGTGATGAATGTAACATAAATGAACATCGGTTCTTGTAGCCTTATACACC
TCTAGATCTAGGAGGTTTTATTGCGGTGGGACTTTGATCAACCAGGAATGGGTGCTACCGGTGCA
CACTGCGACAGGAAAAATATCCGGATAAAGCTTGGTATGCATAGCGAAAAGGTACCAAAATGAGGAT
GCAGAGACAAGAGTCCCAAAGGAGAAGTTCTTTTGTCTCAGTAGCAAAACCTACACCAAAATGGGAC
AAGGACATCATGTTGATGAGCTGAAAAGACCTGTTAACAACAGTACACATCGCGCCTGTCAGCT
TGCCTTCCAACCTCCCACTGTTGGACTCAGTTTGCCGTGTTATGGGATGGGGTACAATCACATCTC
CTCAAGAGACTTATCCCGATGTCCCCATTGTGCTAACATTAACATACTTGATTATGAGGTGTGCA
AGCAGCTCACGGAGGGTTGCCAGCAACAAGCAGAACATTGTGTGCAGGTATCTCGGAGGCAAAAG
TTCATGTAAGGGTGAAGTCTGGGGGACCCCTCATCTGTAAGTCTTAAGCCTGGTGTCTACACCAAG
TCTTCGATTATACTGAGTGGATCCAGAGCAATTGCAGGAAATACAGATGCAACCTGCCCCCATGA
aaacttttgaaaagttaagaggagaaaaatgtaacataattactacatctcttccatatccctaaccat
atccaactacattggaatctattcccaggcagtaagctttttaagactcaaataggactgccttt
gaagtaagaaaatgctcaaaaatagtgtgcagggatcatgtccatttaatttcagiataaaacaat
ctcagittaaatggaggcctgttttagggtagggtagcaataattttctgactctaaaaatgcaccattc
caaaaatttttaacctctgaatacttttccatttctgtccacttctgggacagcggggtccttgatg
ctcttttagactgtcttcttgcagagctttcattaccagctaggtaacatcatcagtgctagaat
attctcttctatttggtacttctgtggcatttacaatacgctcatatggagtcagtcagtcacccia
caaacataatccatataacctgggtcccactgggtgcctaaaaaggaccccagattaacccgcactttcc
aatccataaataagaatcttttgagaatcgtgttttcatgtaaatcttcagggtatccacagc[aaataaa]
[a]tgcataaatcggcataaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

由此, 辽宁省大连蛇岛蝮蛇 (*Gloydius Shedaoensis*) 毒液中类凝血酶基因包含有 1.4kb 的核苷酸。翻译的起始密码子为 ATG (核苷酸 1-3), 终止密码子为 TGA (核苷酸 781-783)。在 3' 端的非编码区距离 16 个多聚腺嘌呤序列 (poly(A)) 上游 15 个核苷酸的位置上, 存在加 poly(A) 的 AATAAA box (核苷酸 1373-1378) 信号。

根据其核苷酸序列, 推导出辽宁省大连蛇岛蝮蛇 (*Gloydius Shedaoensis*) 毒液中类凝血酶基因所编码的蛋白质一级结构如下:

```
MVLIRVLANLLILQLSYAQKSSELIIIGDECNINEHRFLVALYTSRSRIFYCGGTLINQEWVLTAA  
HCDRKNIRIKLGMHSEKVPNEDAETRPKEKFFCLSSKTYTKWDKIMLMRLKRPVNNSTHIAPVS  
LPSNPSPVDSVCRVMWGWTITSPQETYPDVPHCANINILDYEVCAAHGGLPATSRTLCA GILKGG  
KDSCKGDSGGPLICNGQFQGIASWGAHPCGQSLKPGVYTKVFDYTEWISIIAGNTDATCPPE
```

其开放读框包含 780 个核苷酸, 编码 260 个氨基酸。其中, 前面的 24 个氨基酸 (加方框部分) 为信号肽序列, 这说明辽宁省大连蛇岛蝮蛇 (*Gloydius Shedaoensis*) 毒液中类凝血酶在形成成熟蛋白质之前先形成类凝血酶原前体, 其中 A 位置之后为限制性酶切位点。与其他来源的类凝血酶相比较, 该序列具有高度的保守性。表达载体 pPIC9K 中含有成熟类凝血酶基因的全序列。

基于以上叙述, 本发明的显著优势和效果是: ①首次提取、测序和克隆辽宁省大连蛇岛蝮蛇 (*Gloydius Shedaoensis*) 毒液中类凝血酶基因; ②所构建的表达载体和菌株可用于基因工程方法生产类凝血酶作为治疗和预防血栓的药物。因该基因所编码的类凝血酶并不激活 factor XIII, 因此所形成的纤维蛋白血块是非交联的, 并且易于为血浆降解, 从而迅速消除微循环体系中的血栓。所以, 类凝血酶可以作为一种合适的也许更好的替代药物用于治疗心血管疾病和血栓类疾病; 又因为用基因工程的方法生产类凝血酶药物, 克服了来源的限制, 含量的限制, 病人的免疫副反应以及分离纯化成本过高等

等限制因素,其商业价值不可估量。同时,中国和世界范围内的老龄化趋势使得患有心血管疾病和血栓类疾病的病人人数增多,因此用基因工程方法生产类凝血酶药物又有着深远的社会意义。

以下详细叙述本发明的最佳实施例:

实施例 1:

大连蛇岛蝮蛇 (*Gloydius Shedaoensis*) 毒液中类凝血酶基因的获得

①、 蝮蛇毒腺总 RNA 的提取

取秋季捕食期的活蝮蛇，用清洁镊子夹紧其头部，使其咬住清洁的表面皿至毒液流出，放回笼中。不喂食。五天之后，依前叙方法再排毒一次后将其头部用消毒剪刀剪下，取出毒腺，迅速投入到液氮中研磨。提取总 RNA 采用 TRIZOL 试剂盒（GIBICOL 公司，美国）。所有操作均按照试剂盒生产厂商提供的操作指南进行。

②、RT-PCR 方法合成扩增蝮蛇毒腺类凝血酶基因

RT-PCR 方法合成扩增蝮蛇毒腺类凝血酶基因采用 RT-PCR 试剂盒
-----5' - full RACE Core Set (TAKARA 公司, 日本)。

RT 反应条件如下 (20 μ l 体系):

1 μ l 总 RNA+8.5 μ l RNA free H₂O

↓

65° C, 10 min

↓

置于冰上

↓

加入 RT 反应液:

 MgCl_2 4 μ l

RNase Inhibitor	0.5 μ l
AMV Reverse Transcriptase	1 μ l
10X RNA PCR Buffer	2 μ l
d NTP	2 μ l
Oligo dT-adapter Primer	1 μ l



42° C, 30min



95° C, 5min

PCR 反应:

根据同源性, 设计合成 5 端寡聚核苷酸兼引物 TLE-F1, 3 端引物即 TLE-M13M4 由试剂盒提供。引物如下:

TLE- F1 5' ATGGTGCTGATCAGMTG 3' (M=A+T)

TLE- M13 M4 5' CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC 3'

PCR 反应物组成如下:

MgCl ₂	10 μ l
10X LA Taq Buffer	10 μ l
无菌蒸馏水	66.5 μ l
cDNA	1 μ l
dNTP	10 μ l
TLE-F1 (20pmol)	1 μ l
TLE-M13M4 (20pmol)	1 μ l
LA Taq ploymerase (125U)	0.5 μ l

100 μ l

PCR 具体反应条件如下:

98° C	10sec	}	X 30 个循环
55° C	30sec		
72° C	1min		
72° C	10min		
4° C	5min		

③、二次 P C R 扩增大连蛇岛蝮蛇 (*Gloydius Shedaoensis*) 毒液中类凝血酶基因

取 1 μ l 稀释 10 倍的步骤②中 RT-PCR 产物作为模板, 以根据同源性设计的内侧引物 TLE-F2 取代步骤②TLE-F1 进行 PCR 扩增。PCR 反应物组成如下:

10X Ex Taq Buffer	5 μ l
无菌蒸馏水	37.75 μ l
1/10 cDNA	1 μ l
dNTP (2.5 mmol/L)	4 μ l
TLE-F2 (20pmol)	1 μ l
TLE-M13M4 (20pmol)	1 μ l
Ex Taq ploymerase (125U)	0.25 μ l
	50 μ l

PCR 具体反应条件如下:

94° C	2min	
94° C	30sec	} X 30 个循环
60° C	30sec	
72° C	1min	
72° C	1min	
4° C	5min	

④、 测序用模板的制备

将 200 μ l 二次 PCR 产物在 1%琼脂糖凝胶中电泳，在紫外灯下将特异扩增条带切出，装入 SUPREC™-01 离心管（Millipore 公司，美国）中，-80° C 放置 15 分钟，室温下溶解后，于 10, 000 g 离心 5min。将流出液用乙醇沉淀，用 20 μ l 无菌蒸馏水溶解 DNA，-20° C 保存备用。

⑤、 二次 PCR 产物的序列分析

回收的二次 PCR 产物以 TLE-F2 做测序反应，在 ABI377 型自动测序仪上进行序列分析（所有测序工作均委托 TAKARA 大连公司完成）。在第一次序列分析的结果上设计（用程序 SEQUENCE 3.0）测序引物 TLE-F3，再以 TLE-F3 做测序反应测完余下的序列。

引物 TLE-F2 及 TLE-F3 的序列如下：

TLE-F2 5' GTCATTGGAGGTGATGAATG 3'

TLE-F3 5' CATCCCTGTGGTCAAAGTCT 3'

⑥、 大连蛇岛蝮蛇 (*Gloydius Shedaoensis*) 毒液中类凝血酶基因 cDNA 全序列的确定

取 1 μ l 稀释 10 倍的步骤②中 RT - PCR 产物作为模板，分别用引物 TLE-F1 和 TLE-R1；TLE-F1 与 TLE-R3；TLE-F2 和 TLE-M13M4 进行 PCR 扩增。相应的 PCR 产物分别命名为模板 I，模板 II，模板 III。

反向引物的序列如下:

TLE-R1 5' TTTGGGACTCTGTGTGTGC 3'

TLE-R3 5'CCATAACACGGCAAATAAG 3'

TLR-R4 5' CTTACTGCCTGGGAATAGAT 3'

PCR 反应物组成如下:

10X Ex Taq Buffer	10 μ l
-------------------	------------

无菌蒸馏水	76.5 μ l
-------	--------------

1/10 cDNA	1 μ l
-----------	-----------

dNTP (2.5 mmol/L)	8 μ l
-------------------	-----------

TLE-F (20pmol)	2 μ l
----------------	-----------

TLE-M13M4/R (20pmol)	2 μ l
----------------------	-----------

Ex Taq ploymerase (125U)	0.5 μ l
--------------------------	-------------

100 μ l

PCR 具体反应条件如下:

94° C	2min	
94° C	30sec	} X 30 个循环
60° C	30sec	
72° C	1min	
72° C	1min	
4° C	5min	

取 5 μ l PCR 产物, 经 3%琼脂糖凝胶电泳检测。回收 PCR 产物作为测序用模板。方法与步骤④相同。分别用模板 I-引物 TLE-R1、模板 II-引物 TLE-R3、模板 III-引物 TLE-R4 作反应, 测序。由此, 获得大连蛇岛蝮蛇 (*Gloydius*

Shedaoensis) 毒液中类凝血酶基因 cDNA 全序列。

实施例 2:

大连蛇岛蝮蛇 (*Gloydius Shedaoensis*) 毒液中类凝血酶基因在表达载体 pPIC9K 中的克隆及转化大肠杆菌 JM109

①PCR 合成在 5'端和 3'端分别含有两个酶切位点的成熟类凝血酶基因

根据实施例 1 中步骤⑥测序结果,设计出两条引物扩增成熟类凝血酶基因。其中正向引物 LIGF1 的 5'端包含有表达载体 pPIC9k α -factor signal 序列中的 Ste13 酶切位点;反向引物 TDLR1 的 5'端包含有 EcoR1 的酶切位点。以实施例 1 中步骤②RT-PCR 产物作为模板,通过 PCR 反应产生出在 5'端和 3'端分别含有两个酶切位点的成熟类凝血酶基因。

两条引物的序列如下:

LIGF: 5'GAAAAGAGAGGCTGAAGCTATCATTGGAGGTGATGAATG3'

TDLR1: 5'CCGAATTCTTATCATGGGGGCGAGGTGCA3'

PCR 反应物组成如下:

10X Pyrobest Buffer	5 μ l
无菌蒸馏水	37.75 μ l
1/10 cDNA	1 μ l
dNTP (2.5 mmol/L)	4 μ l
LIGF1 (10pmol)	1 μ l
TDLR1 (10pmol)	1 μ l
Pyrobest ploymerase (125U)	0.25 μ l
<hr/>	
	50 μ l

PCR 具体反应条件如下:

94° C 1min

98° C	10sec	}	X 30 个循环
55° C	30sec		
72° C	1.5min		
4° C	5min		

②PCR 方法合成成熟类凝血酶基因 5'端部分序列的 α -factor signal 序列

根据表达载体 pPIC9k α -factor signal 核苷酸序列以及成熟类凝血酶基因序列, 设计出两条引物。其中正向引物 LIGF2 为 α -factor signal 5'端序列, 反向引物 LIGR1 为 5'端携带有成熟类凝血酶基因 5'端序列而 3'端含有 α -factor signal 序列 Stel3 酶切位点的序列。

两条引物的序列如下:

LIGF2: 5'CAAACGATGAGATTCCTTC3'

LIGR1: 5'ATTCATCACCTCCAATGATAGCTTCAGCCTCTCTTTTC3'

PCR 反应物组成如下:

10X Pyrobest Buffer	5 μ l
无菌蒸馏水	37.75 μ l
pPIC9K (1ng/ μ l)	1 μ l
dNTP (2.5 mmol/L)	4 μ l
LIGF2 (10pmol)	1 μ l
LIGR1 (10pmol)	1 μ l
Pyrobest ploymerase (125U)	0.25 μ l

50 μ l

PCR 具体反应条件如下:

94° C	1min	}	X 30 个循环
98° C	10sec		
55° C	30sec		
72° C	1.5min		
4° C	5min		

③PCR 方法将成熟类凝血酶基因插入表达载体 pPIC9K α -factor signal 序列中

将步骤①和②中的 PCR 产物各取 0.5 μ l 作为模板，以正向引物 LIGF2 和反向 TDLR1 作为引物，进行 PCR 连接反应。其他反应物组成与反应条件同步骤①。

④步骤③中 PCR 产物的处理

首先，将 PCR 产物进行纯化。纯化方法如下：

100 μ l PCR 产物
 ↓ 加入 10 μ l 3M NaAc 和 300 μ l 100% 乙醇
 混匀，-80° C 冷冻 10min
 ↓
 12,000rpm 离心 10min, 4° C，弃上清
 ↓ 加入 70%乙醇 1 ml, 混匀
 12,000rpm 离心 5min, 4° C，弃上清
 ↓
 离心干燥，3 min

然后，将纯化产物用 BamH1 酶消化。酶消化反应条件如下：

纯化产物

K buffer	10 μ l
BamH1 (TAKARA, 大连)	10 μ l
无菌蒸馏水	80 μ l

100 μ l, 37° C, 2 小时

之后, 将酶消化产物纯化。纯化后的产物作平端化处理。平端化处理

反应条件如下:

Blunting buffer	1 μ l
T ₄ DNA 连接酶	1 μ l
H ₂ O	8 μ l

10 μ l, 37° C, 10min

然后, 将上述平端化产物纯化之后, 用 EcoR1 酶消化。酶消化反应条

件如下:

上一步纯化后平端化产物

10x buffer	10 μ l
EcoR1 (TAKARA, 大连)	10 μ l
无菌蒸馏水	80 μ l

100 μ l, 37° C, 2 小时

最后, 重复纯化步骤以除去 EcoR1。

⑤表达载体 pPIC9K 的处理

表达载体 pPIC9K 的处理也要经过 BamH1 消化, 纯化, 平端化, 纯化,

EcoR1 消化, 纯化等与步骤④相同的处理。

⑥成熟类凝血酶基因在表达载体 pPIC9K 中的重组

载体与目的基因的连接反应:

处理后的 pPIC9K (50ng/ μ l)	1 μ l
处理后的目的基因 (25ng/ μ l)	5 μ l
Solution I (TAKARA, 大连)	6 μ l

12 μ l, 16 $^{\circ}$ C, 4 小时

⑦重组子转化大肠杆菌 JM109

取 10 μ l 重组质粒与 100 μ l 感受态 JM109 细胞混匀, 冰浴半小时后热击转化, 42 $^{\circ}$ C, 45 秒。在冰中放置 2 分钟后, 加入 0.94ml SOC 液体培养基, 37 $^{\circ}$ C 震荡 (160-225rpm) 1 小时。取 100 μ l 涂 LB 平板, 37 $^{\circ}$ C 过夜培养。PCR 法检测阳性克隆。挑取阳性克隆提质粒。测序, 与实施例 1 中 cDNA 序列一致。

实施例 3:

含大连蛇岛蝮蛇 (*Gloydius Shedaoensis*) 毒液中类凝血酶基因的表达式 pPIC9K 整合至毕赤酵母细胞 GS115 基因组中

① 重组质粒的线形化

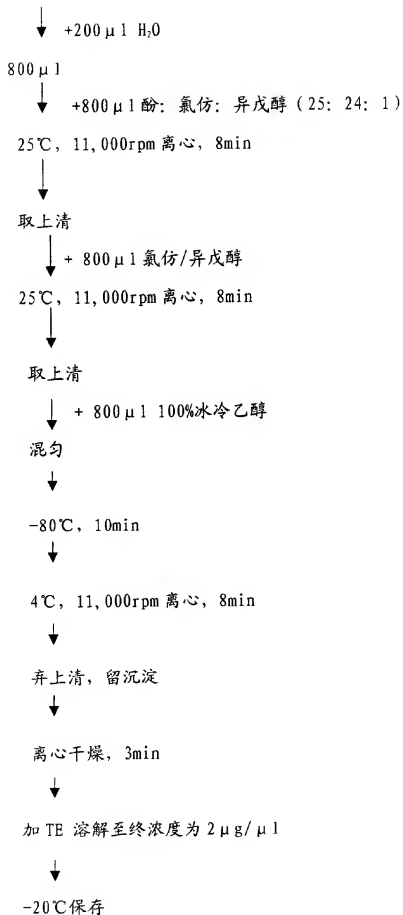
重组质粒经 SacI 酶消化后, 成为线形质粒。消化反应条件如下:

重组质粒	480 μ l
10x L buffer	60 μ l
SacI (10U/ μ l)	60 μ l

600 μ l, 37 $^{\circ}$ C, 过夜

② 酶切产物的纯化

酶切产物 600 μ l



③ 电击转化

80 μ l 新鲜培养 GS115 细胞+10 μ l 步骤②重组质粒



混匀后置入 0.2cm 冰冷电击槽中



在冰中保温 5 分钟



电击转化(电击仪: 1500V, Bio-Rad E.coli Pulser, 美国)



立即加入 1M Sorbitol 1ml



转移至 eppendorf 离心管中



涂 MD 平板, 30℃培养

挑取阳性菌落, 进行 PCR 检菌。至此, 得到含大连蛇岛蝮蛇 (*Gloydius Shedaoensis*) 毒液中类凝血酶基因的表达菌株-----毕赤酵母细胞 GS115。